

MINISTERIE VAN LANDBOUW

BESTUUR VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

RIJKSCENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK
GENT

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE

Directeur : P. HOVART

**VERGELIJKEND ONDERZOEK VAN DRIE METHODEN
VOOR DE BEPALING VAN DE
TOTALE VLUCHTIGE BASISCHE STIKSTOF (TVB) IN VIS**

door

W. VYNCKE



Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)
Publikatie nr 207, 1985

MINISTERIE VAN LANDBOUW

BESTUUR VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK

RIJKSCENTRUM VOOR LANDBOUWKUNDIG ONDERZOEK
GENT

RIJKSSTATION VOOR ZEEVISSERIJ - OOSTENDE

Directeur : P. HOVART

**VERGELIJKEND ONDERZOEK VAN DRIE METHODEN
VOOR DE BEPALING VAN DE
TOTALE VLUCHTIGE BASISCHE STIKSTOF (TVB) IN VIS**

door

W. VYNCKE

Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij (C.L.O. Gent)
Publikatie nr 207, 1985

D/1985/0889/1

1. INLEIDING.

Alhoewel een van de oudste methoden om de versheid van vis chemisch te bepalen, wordt de dosering van de totale vluchtige basische stikstof (TVB) nog steeds veelvuldig toegepast. Het is zelfs zo dat de jongste jaren in diverse landen meer en meer importerende firma's en/of controle-autoriteiten TVB-normen opleggen. Aangezien geen universele standaardmethode bestaat rijst hier het probleem van de vergelijkbaarheid van de resultaten bekomen met diverse analysetechnieken.

Voor de TVB-bepaling worden hoofdzakelijk drie soorten methoden aangevend : mikrodiffusie, rechtstreekse destillatie met een zachte base en destillatie van een alkalisch gemaakte eiwitvrij visextract. Voor meer details wordt naar een vroegere publikatie verwezen (1).

Eén van de eenvoudigste methoden qua apparatuur en aantal bewerkingen is de rechtstreekse destillatie van vis met magnesiumoxyde volgens Lücke en Geidel (2). Antonacopoulos maakte deze methode handiger en vlugger van uitvoering door gebruik te maken van stoomdestillatie (3). Hiervoor is evenwel een speciaal destilleerapparaat nodig. Om deze reden wordt vooral in bedrijfslaboratoria de originele methode nog frekwent toegepast.

Het doel van onderhavig onderzoek was na te gaan in hoeverre de met beide methoden bekomen resultaten vergelijkbaar zijn. Van de gelegenheid werd gebruik gemaakt om een derde methode uit te testen. Deze methode, door Pantaléon (4) voorgesteld, maakt gebruik van lithiucarbonaat i. p. v. magnesiumoxyde en daarenboven wordt Carrez-oplossing (zinkacetaat en kalium-hexacyanoferraat) toegevoegd waardoor volgens de auteur de hydrolyse van de protiden met vorming van ammoniak wordt vermeden.

2. EXPERIMENTELE METHODIEK

2.1. Vis.

Kabeljauw, schol en haring van diverse versheidsgraden werden gebruikt. In het totaal werden vijftig analyzen in duplo uitgevoerd.

2.2. Methoden.

- Destillatie met magnesiumoxyde volgens Lücke en Geidel (2) (zie appendix 1). De destillatieduur werd evenwel tot 15 min beperkt, daar uit oriënterend onderzoek gebleken was dat deze duur voldoende was.
- Stoomdestillatie met magnesiumoxyde volgens Antonacopoulos (3) (zie appendix 2).
- Destillatie met lithiumcarbonaat volgens Pantaléon (4) (zie appendix 3). Hierbij werden volgende varianten eveneens uitgetest : stoomdestillatie i. p. v. gewone destillatie en gemalen vis i. p. v. met water gehomogeniseerde vis. In dit laatste geval werd ook stoomdestillatie toegepast.

3. RESULTATEN EN BESPREKING.

3.1. Vergelijking van de drie methoden.

Tussen de drie vissoorten werden geen verschillen genoteerd. De TVB-waarden werden dan ook samen statistisch verwerkt. De significantie van de resultaten bereikte min. 99 %.

Tabel 1 geeft de korrelatiecoëfficiënten en regressievergelijkingen weer. Het gelijkstellen van de intercepten aan nul bleek de betrouwbaarheid van de regressies niet significant te doen dalen. Verder bleken de richtingscoëfficiënten niet wezenlijk van 1 te verschillen. Dit betekent dat de resultaten van de drie methoden rechtstreeks vergelijkbaar zijn. Er hoeven aldus geen korrektiefactoren te worden ingevoerd.

Tabel 1 - Regressies tussen de methoden van Pantaléon (P),
Antonacopoulos (A) en Lücke en Geidel (L) (*).

Metode	Korrelatie- koëfficiënt	Regressievergelijking
P - A ($a \neq 0$)	0,976	$P = - 0,195 + 0,968 A$
($a = 0$)	0,976	$P = 0,964 A$
L - A ($a \neq 0$)	0,990	$L = - 2,420 + 1,071 A$
($a = 0$)	0,988	$L = 1,016 A$
L - P ($a \neq 0$)	0,980	$L = 2,671 + 1,015 P$
($a = 0$)	0,977	$L = 1,079 P$

(*) a = intercept

3.2. Invloed van de destillatieduur.

Ten einde na te gaan hoeveel TVB vrijkomt bij verlengde destillatieduur werd op tien monsters van elke vissoort na de opgegeven duur nog tweemaal tien min verder gedestilleerd en telkens de TVB bepaald. Uit de resultaten vermeld in tabel 2 volgt vooreerst dat het gebruik van lithium-carbonaat en het toevoegen van het Carrez-reagens bij de methode van Pantaléon zeker de afbraak van eiwitten, peptiden en aminozuren niet verhindert. Integendeel, de TVB-stijging was bij deze methode het sterkst en significant verschillend van de twee andere methoden. De reproduceerbaarheid was evenwel beter : de variatiekoëfficiënten lagen significant lager. Tussen de drie vissoorten werden geen wezenlijke verschillen genoteerd.

In verband met de destillatieduur kan tenslotte worden opgemerkt dat indien de originele methode van Lücke en Geidel wordt toegepast (25 min destillatie), de TVB-waarden ca 3 mg hoger liggen. Bij de vergelijking van methoden dient hier eventueel rekening mede gehouden te worden.

Tabel 2 - Gemiddelde TVB-stijging (mg N/100 g) in 10 min (*).

Soort	Antonacopoulos	Pantaléon	Lucke & Geidel
Haring	2,3 (28,0 %)	7,5 (12,5 %)	2,7 (28,0 %)
Kabeljauw	2,4 (19,7 %)	9,6 (12,2 %)	4,3 (22,1 %)
Schol	2,1 (30,0 %)	9,5 (17,5 %)	3,3 (24,3 %)
Gemiddeld	2,3 (26,3 %)	8,9 (14,2 %)	3,4 (24,9 %)

(*) Variatiekoëfficiënt tussen haakjes.

3.3. Reproduceerbaarheid.

Aan de hand van de dubbelproeven werden de standaardafwijkingen van de drie methoden berekend. Voor Antonacopoulos bedroeg dit 0,86, voor Lucke & Geidel 2,60 en voor Pantaléon 2,30 mg N/100 g. De waarde voor de methode van Antonacopoulos lag significant lager dan deze voor de twee andere methoden. Dit wijst erop dat de stoomdestillatie meer reproduceerbare resultaten dan de gewone destillatie geeft. Tussen de drie vissoorten werden geen verschillen genoteerd.

3.4. Modifikatie van de methode van Pantaléon.

Het toepassen van stoomdestillatie en het gebruik van gemalen vis beïnvloedde nauwelijks de resultaten.

De regressies tussen stoomdestillatie en gewone destillatie enerzijds en gemalen vis en met water gehomogenizeerde vis anderzijds zijn in tabel 3 vermeld. De intercepten en de richtingskoëfficiënten waren niet significant verschillend van 0 en 1 respectievelijk.

De standaardafwijkingen bekomen met de stoomdestillatie (1,32 mg) en met gehomogenizeerde vis (0,99 mg) waren niet significant verschillend van deze bekomen met de methode van Antonacopoulos (0,86 mg), hetgeen de gunstige invloed van de stoomdestillatie bevestigt.

Tabel 3 - Regressie tussen de methode van Pantaléon met stoomdestillatie (P_{SD}) of gewone destillatie (P_{GD}) en het gebruik van gemalen vis (P_{GM}) of met water gehomogenizeerde vis (P_{GH}) (*).

Metode	Regressiecoëfficiënt	Regressievergelijking
$P_{SD} - P_{GD}$ ($a \neq 0$)	0,991	$P_{SD} = -0,810 + 0,999 P_{GD}$
($a = 0$)	0,991	$P_{SD} = 0,980 P_{GD}$
$P_{GM} - P_{GH}$ ($a \neq 0$)	0,988	$P_{GM} = 1,233 + 0,972 P_{GH}$
($a = 0$)	0,987	$P_{GM} = 1,005 P_{GH}$

(*) a = intercept.

4. BESLUITEN.

In de praktijk kunnen de met de drie methoden bekomen TVB-waarden met een goede benadering rechtstreeks worden vergeleken. De stoomdestillatie volgens Antonacopoulos is evenwel wegens zijn grotere eenvoud en hogere reproduceerbaarheid de meest aangewezen methode, zeker in laboratoria die regelmatig TVB-bepalingen uitvoeren. Het gebruik van lithiumcarbonaat en Carrez-reagens tenslotte brengt geen enkel voordeel op.

Bibliografie.

- (1) Vyncke, W. (1983) : Determination of total volatile bases in fish : a review of methodology, Mededelingen van het Rijksstation voor Zeevisserij, nr 193.
- (2) Lucke, F. en Geidel, W. (1935) : Zeitschrift für Untersuchung der Lebensmittel, 70, 441.
- (3) Antonacopoulos, N. (1968) : in : Acker, I. (Ed.), Handbuch der Lebensmittelchemie, Vol. III/2, Springer Verlag, Berlin, p. 1482.
- (4) Pantaléon, J. (1970) : in : FAO Fisheries Reports No 81, vol. 2, Paper PE : FIC/69/TN/5.
- (5) Pearson, D. (1976) : The Chemical Analysis of Foods, 7th Ed., Churchill Livingstone, Londen, p. 386.

Bedanking.

De Heer R. Moermans, van het Bureau voor Biometrische Verwerking (C. L. O. Gent) heeft de regressieanalysen uitgevoerd.

Summary.

Comparison of three methods for determining total basic volatile nitrogen (TVN) in fish.

The three methods under investigation belong to the group of techniques making use of direct distillation with a weak base.

The Lucke and Geidel (2) method is carried out with magnesium oxide and normal distillation. Antonacopoulos (3) used the same technique but with steam distillation. Pantaléon (4) preferred lithium carbonate and the addition of zinc acetate and potassium hexacyanoferrate (Carrez-reagent) to avoid decomposition of the proteins. Normal distillation is applied.

The three methods were carried out as mentioned in appendices 1, 2 and 3. The distillation time with the Lucke and Geidel method however was reduced to 15 min. Steam distillation and the use of minced fish instead of a fish-water homogenate were also tested as modifications to the original Pantaléon method. Fifty samples of cod, plaice and herring of varying degrees of freshness were analyzed in duplicate. Regression analyses between the three methods (table 1) gave high correlation coefficients. Moreover, the intercepts and slopes were not significantly different from 0 and 1 respectively. This means that the TVB-values obtained with the three methods can be compared directly.

Table 2 gives the average TVN-increase in 10 min. The use of lithium carbonate and the Carrez-reagent did not prevent the decomposition of protides. On the contrary, the average increase was significantly higher.

The standard deviations were calculated from the duplicates. The reproducibility of the Antonacopoulos method ($s = 0,86$ mg) was significantly better than the Lucke and Geidel and Pantaléon-methods where the standard deviations were 2,60 and 2,30 respectively. There were no differences between the fish species.

The use of steam distillation instead of normal distillation and minced fish instead of homogenized fish in the method of Pantaléon did not influence results significantly.

Although TVN-values obtained with the three methods can be compared directly, the method of Antonacopoulos is to be preferred as it has a higher precision and is easier to carry out.

Appendix 1.Determination of TVN according to Lücke and Geidel (2) (*).

Set up a macro-Kjeldahl distillation apparatus. Macerate mechanically 10 g minced fish with 100 ml tap water and wash into the distilling flask with 200 ml tap water. Add 2 g magnesium oxide and an anti-foaming agent (an "Antifoam" silicone preparation or octylalcohol). To the 500-700 ml receiving flask add 15 ml of 2 % boric acid solution and a few drops of screened methyl red indicator as used in the determination of protein. Connect up the apparatus with the receiver tube dipping below the boric acid solution. Heat the distillation flask so that the liquid boils in exactly 10 min. and, using the same rate of heating, distil for exactly 25 min. Wash down the condenser with distilled water and titrate the distillate with 0.05 M (0.1N) sulphuric acid. Multiply the titration (less blank) by 14 to obtain the TVN as mg N per 100 g flesh.

(*) This text was taken from Pearson (5). The only small modification to the original method is the use of boric acid instead of standard sulphuric acid.

Appendix 2.

Determination of TVN according to Antonacopoulos (3).

Apparatus.

Precision balance (or horn pan balance for weighings on board ship)
"Antona" apparatus with extended outlet or an appropriate projection
from the condenser.

Gas burner or electric heating mantle for 2 litre round-bottom flask.

Powder funnel, diameter at top 10 cm, at bottom 2 cm.

10 or 25 ml burette for the 0.1 N acid.

500 ml Erlenmeyer flask.

Reagents.

Magnesium oxide.

Silicon anti-foaming agent.

Approximately 3 % boric acid.

0,1 N hydrochloric or sulphuric acid.

Tashiro indicator mixture (methyl red and methylene blue).

Separation of the TVN.

1. Put about 1 litre of distilled water and a few boiling stones into a steam generator (a 2 litre round-bottomed flask) ; heat with the glass cock open.
2. 10 ml approximately 3 % boric acid, about 8 drops Tashiro indicator mixture and sufficient distilled water (about 100 ml) to immerse the outlet from the condenser into a 500 ml broad necked Erlenmeyer flask which serves as a collecting vessel.
3. Introduce 10 g of the fish, thoroughly homogenized, immediately beforehand, into the insert of the "Antona" apparatus through the powder funnel. Rinse with a little water so that the sample is on the bottom of the insert.

4. Add 2 - 3 drops of the silicon anti-foaming agent and about 1 teaspoonful (2 g) of magnesium oxide.
5. The insert is immediately transferred into the pre-heated steam generator.
6. Connect the bridge to the condenser at once.
7. Bring the water to boiling point with the glass cock open in order to prevent dilution by condensation, which would retard the process of separation.
8. Close the cock when boiling starts and distill for 10 minutes with the outlet tube from the condenser immersed, and for 2 minutes with it above the surface (lower the collecting vessel).
9. When distillation is completed :
 - (a) rinse the condenser outlet with a little distilled water, into the collecting vessel, and then remove the collecting vessel.
 - (b) open the cock in the flask.
 - (c) put out the flame or disconnect the electric heater.
 - (d) remove the reaction mixture from the flask while it is still hot in order to prevent the ground glass joints from sticking (grease the joints well).

Determination of volatile basic nitrogen.

Titrate the distillate containing the volatile basic nitrogen in the collecting flask against the 0.1 N acid until the neutral point is reached. (The colour changes from green to red-violet ; the solution is grey at the neutral point).

Appendix 3.

Dosage de l'azote basique volatil total d'après Pantaléon (4).

Principe de dosage : l'ABVT déplacé par le carbonate de lithium (base faible n'hydrolysant ni l'urée, ni les protides et acides aminés) est entraîné par la vapeur d'eau. Le distillat est titré par l'acide sulfurique.

Matériel : un ballon Pyrex de 500 ml, avec système de raccordement à un tube réfrigérant droit (montage permettant un barbotage de l'extrémité inférieure du réfrigérant dans un bécber de 100 ml). L'expérience montre qu'il y a intérêt à utiliser un montage avec rodages sphériques maintenus par pinces, qui se démontent facilement même à chaud et assurent une étanchéité suffisante.

Réactifs : eau fraîchement distillée, silicone Rhodorsil (antimousse 426), ferrocyanure de potassium à 15 % dans l'eau, acétate de zinc à 30 % dans l'eau, solution de phénol-phtaléine à 2 % dans l'alcool à 90°, solution de carbonate de lithium à saturation (environ 8 %), solution aqueuse d'alizarine sulfonate de sodium à 0,5 % et solution décimale d'acide sulfurique.

Protocole opératoire : Peser 10 g de denrée à analyser. S'il s'agit d'un produit ayant séjourné dans l'huile (sardines en boîtes) ou dans un liquide (thon au naturel) avoir soin de l'assorer entre des feuilles de papier filtre. Mettre dans un flacon cylindrique à large ouverture de 250 ml avec 50 ml d'eau distillée. Broyer avec un mixer rapide. Verser le broyat dans le ballon de l'appareil à distiller. Rincer le flacon et la tige du broyeur avec 50 ml d'eau. Verser les eaux de rinçage dans le ballon. Puis ajouter successivement en agitant chaque fois : 3 gouttes de Rhodorsil, 1 ml de solution de ferrocyanure de potassium, 1 ml de solution d'acétate de zinc, 2 gouttes de solution de phénol-phtaléine, 20 ml de solution de carbonate de lithium. Cette dernière adjonction s'accompagne d'un virage au rouge franc de la phénol-phtaléine. Relier aussitôt le ballon au

réfrigérant descendant dont l'extrémité aboutira dans un b cher de 100 ml contenant 20 ml d'eau distillée et 5 gouttes d'alizarine. Le distillat doit tomber directement dans ce mélange, la partie inférieure du réfrigérant étant immergée. Chauffer le ballon à ébullition et lorsque le virage au violet de l'alizarine est amorcé, poursuivre encore la distillation pendant 20 minutes. Séparer le ballon du réfrigérant. Rincer l'appareil distillatoire et recueillir les eaux de lavage dans le b cher. Doser l'ABVT, à l'aide de la solution d'acide sulfurique décinormale, par le virage au jaune paille de l'alizarine.

Repro-fotografie C.L.O. Gent
Burg. van Gansberghelaan, 96 9220 Merelbeke

